

## **5. Тема занятия: Получение и подготовка биологического материала для диагностики вирусных инфекций.**

**Цель занятия:** Знакомство со способами получения и подготовки биологического материала. Изучение методов фиксации и окраски мазков.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать способы забора биологического материала
- Ознакомиться с правилами хранения, маркировки и транспортировки биологического материала
- Уметь микроскопически дифференцировать способы окраски мазков

### **Условия взятия материала для клинических лабораторных исследований**

Наиболее распространенным материалом для лабораторных исследований является кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости.

Взятие материала для лабораторных исследований должно проводиться **до принятия обследуемым пищи (натошак)**. Последний прием пищи за 8–12 часов (12 часов для исследований липидного спектра) до взятия. Исключением из этого правила являются исследования, которые проводятся при неотложных состояниях, в любое время, но с учетом этого фактора.

**Время** взятия с 7 до 9 ч утра при плановых исследованиях и в любое время для срочных случаев диагностики (неотложные состояния). Не допустим забор крови для плановых биохимических исследований накануне вечером.

### **Получение крови для клинических лабораторных исследований**

1. Нативная венозная кровь, взятая из крупных вен (чаще из локтевой) без применения антикоагулянтов.

2. Венозная кровь с добавлением антикоагулянтов.

3. Капиллярная кровь из пальца для определения глюкозы, общего анализа крови (ОАК) и других компонентов.

4. Артериальная кровь, взятая из крупных артерий (чаще бедренной или подключичной) – для определения газов крови.

### **Получение мочи для клинических лабораторных исследований**

Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них.

Моча, собранная для анализа, может храниться не более 1,5 – 2 часов (обязательно на холоде). Длительное стояние ведет к изменению физических свойств, размножению бактерий и разрушению элементов осадка мочи. При этом рН мочи будет сдвигаться к более высоким значениям из-за аммиака, выделяемого в мочу бактериями. Микроорганизмы потребляют глюкозу, поэтому при глюкозурии можно получить отрицательные или заниженные результаты. Желчные пигменты разрушаются при дневном свете. Наиболее приемлемый способ сохранения мочи - охлаждение (можно хранить в холодильнике, но не доводить до замерзания). При охлаждении не разрушаются форменные элементы, но возможно влияние на результаты определения относительной плотности.

Далее сбор мочи, в зависимости от вида исследования, имеет свои особенности.

1. Для проведения **общего анализа мочи** собирают только утреннюю мочу, взятую в середине мочеиспускания, так как она более концентрированная и с ней вымываются патологические элементы, скопившиеся в почках и в мочевыводящих путях за ночь.

2. Для проведения **пробы по Зимницкому** (оценка концентрационной способности почек) за сутки собирают 8 порций мочи. Условием правильного проведения пробы, является исключение избыточного потребления воды. Необходимо предупредить больного о том, что желательно, чтобы количество принимаемой жидкости в день сбора мочи не превышало 1-1,5 л. В остальном пациент остается в обычных условиях, принимает обычную пищу, но учитывает количество выпиваемой за сутки жидкости.

Заранее необходимо подготовить 8 чистых сухих банок для сбора мочи. Каждую банку подписывают, указывая фамилию и инициалы пациента, отделение, дату и время сбора мочи.

- 1-я банка – с 6 до 9 часов,
- 2-я – с 9 до 12 часов,
- 3-я – с 12 до 15 часов,
- 4-я – с 15 до 18 часов,
- 5-я – с 18 до 21 часа,
- 6-я – с 21 до 24 часов,
- 7-я – с 24 до 3 часов,
- 8-я – с 3 до 6 часов.

Собирают за сутки 8 порций мочи. В 6 часов утра больной опорожняет мочевой пузырь (эта порция выливается). Затем, начиная с 9 часов утра, точно каждые 3 часа собирают 8 порций мочи в отдельные банки (до 6 часов утра следующего дня). Все порции доставляют в лабораторию. Вместе с мочой доставляют сведения о количестве принятой за сутки жидкости.

3. Для определения количества форменных элементов в 1 мл мочи по **методу Нечипоренко** (выявление скрытого воспалительного процесса) собирается средняя порция первой утренней мочи – не более 15-20 мл.

4. **Двухстаканная проба** чаще используется в урологии у женщин. Мочу при мочеиспускании делят на две части. Важно, чтобы первая порция в этом случае была небольшой по объему. Посуду также готовят предварительно и указывают номер порции на каждом сосуде.

5. **Сбор суточной мочи.** Пациент собирает мочу в течение 24 часов, соблюдая обычный питьевой режим (1,5-2 л в сутки). Утром в 6-8 часов он опорожняет мочевой пузырь и отмечает время (эту порцию мочи выливают), а затем в течение суток собирают всю мочу в чистый широкогорлый сосуд емкостью не менее 2 л, с плотно закрывающейся крышкой. Последняя порция берется точно в то же время, когда накануне был начат сбор (время начала и конца сбора отмечают). Если не вся моча направляется в лабораторию, то количество суточной мочи измеряют мерным цилиндром, отливают часть в чистую посуду, в которой ее доставляют в лабораторию, и обязательно указывают объем суточной мочи.

6. **Порядок подготовки для проведения исследования на пробу Реберга (оценка секреторной и экскреторной функции почек):**

1. Утром помочиться в туалет.
2. Выпить 300-400 мл жидкости.
3. Через 10-15 минут помочиться в туалет.
4. Лечь в постель и через 60 и через 120 минут помочиться в отдельную посуду
5. Измерить объем мочи.

(2раза)

6. В промежутке между опорожнением мочевого пузыря взять кровь для исследования на креатинин.

Доставить в лабораторию и провести исследование в тот же день.

7. **3-стаканная проба.** Используется для установления уровня гематурии и источника лейкоцитурии. Пробу проводят только в утренние часы без предварительного туалета наружных половых органов. Без перерывов в акте мочеиспускания больной собирает мочу в 2 сосуда, не опорожняя полностью мочевого пузыря. Затем после массажа простаты в 3-ий сосуд собирается 3-я порция мочи.

#### *Соскоб эпителиальных клеток из урогенитального тракта женщины.*

Соскобы производят из трех точек тремя разными зондами: цервикальный канал, задний свод влагалища, уретра – в одну пробирку, поочередно ополаскивая каждый зонд. При необходимости берут материал из эрозивно-язвенных поражений. Отделяемое забирают в небольшом количестве. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов.

Ни в коем случае нельзя смачивать в пробирках типа «Эппендорф» зонды перед забором отделяемого, т. к. они заполнены или содержат транспортную среду (может вызвать зуд, раздражение, ожог)!

Для получения мазков урогенитального тракта наносят материал зондом на предметное стекло и подсушивают на воздухе.

#### *Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин.*

Перед взятием соскоба из уретры необходимо воздержаться от мочеиспускания в течение не менее двух часов. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим зондом (после чего его выкидывают). Вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку типа «Эппендорф» с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10-15 сек., избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки. Отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов. В процедурном кабинете должен быть запас стерильных зондов (либо тампонов) для удаления слизи. Шпатель гинекологический входит в гинекологический набор.

Для получения мазка, вынув зонд из уретры, наносят мазок такими же вращательными движениями в обратном направлении (против часовой стрелки) на всю поверхность предметного стекла тонким слоем.

#### *Сперма.*

Взятие спермы осуществляют в стерильный одноразовый флакон. Для анализа спермограммы каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Анализируют нативный препарат в темном поле.

#### *Мокрота.*

Взятие материала осуществляют утром натощак после гигиены полости рта при глубоком откашливании в количестве не менее 0,5 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл.

#### *Биопсийный материал.*

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащие 0,5 мл транспортной среды. Возможно приготовление препарата сразу после взятия материала (мазки-отпечатки, распределение материала по предметному стеклу).

#### *Спинномозговая жидкость (ликвор).*

Взятие ликвора производится только врачом в условиях стационара. Ликвор получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами.

#### *Слюна.*

Перед взятием материала следует провести тщательную гигиену полости рта (почистить зубы, прополоскать рот водой до полного удаления зубной пасты) через 30 минут можно начинать сбор слюны в стерильную емкость. Забор слюны можно производить в течение дня.

### **Правила взятия и доставки биологических материалов для вирусологических исследований**

Любые пробы (в том числе нестерильные, например, фекалии) для вирусологического исследования берут, соблюдая правила асептики, с целью предотвращения его дополнительного загрязнения посторонней микрофлорой. Взятые для исследования материалы рекомендуется помещать в стеклянные флаконы или посуду из нетоксичной пластмассы с завинчивающейся пробкой. Пробы следует сохранять влажными и на холоду, не замораживая, поскольку ряд вирусов (в частности, возбудители респираторных вирусных инфекций) характеризуется низкой выживаемостью во внешней среде. Для сохранения жизнеспособности вирусов некоторые пробы (мазки из носоглотки, соскобы кожных поражений) погружают в стабилизирующую среду, состоящую из нейтрального изотонического раствора, белка и антибиотиков. Можно также пользоваться раствором Хенкса или средами для тканевых культур (гидролизат лактальбумина, среды 199, Игла и т.д., содержащие 10% прогретой сыворотки крупного рогатого скота или бычьего альбумина) с антибиотиками (200-1000 ЕД пенициллина, 200-1000 мг стрептомицина и 50-100 ЕД нистатина), подавляющими рост бактерий и грибов, которые приводят к аутолизу белков и разрушению вирусов.

#### **Кровь.**

Для выделения вирусов и серологического исследования берут 10 мл крови. Сыворотку крови, взятую для серологических исследований, в случае ее возможной нестерильности, можно заморозить, что предотвращает бактериальный рост и сохраняет ранние макроглобулиновые антитела. Первую пробу крови для серологического

исследования берут на 3-4 дни болезни, вторую – на 10-15. Так как при некоторых вирусных инфекциях антитела накапливаются медленно, целесообразно взять третью пробу на 25-30-й день.

Материал из верхних дыхательных путей.

Мазки из глотки берут ватным тампоном, не касаясь языка и щек, тщательно протирая заднюю стенку глотки, после чего опускают тампон в стабилизирующую среду. У детей в возрасте до 2 лет вирусы можно выделять из носоглоточного секрета. Из него делают также мазки для исследования методом иммунофлюоресценции.

Спинномозговая жидкость.

Вирусы из спинномозговой жидкости выделяют при менингитах, реже при энцефалитах.

Фекалии.

Кусочки кала, массой 4-8 г, помещают в сухой стерильный флакон. Можно также исследовать ректальные мазки, однако частота выделения вируса из них ниже, чем из кала.

Соскобы и мазки с конъюнктивы.

Соскоб с конъюнктивы снимают тонким стерильным шпателем после локальной легкой анестезии и делают мазок на предметном стекле. Для выделения вируса производят смыв с конъюнктивы стабилизирующей средой или берут пробу тампоном, помещая его затем во флакон со средой.

Кожные поражения.

Исследованию подвергают поврежденные участки (везикулярная жидкость, корочки, кусочки опухоли и т.п.).

Трупный материал.

Желательно брать как можно скорее, так как содержание вируса в тканях после смерти резко снижается в результате их аутолиза, вызванного размножением бактерий. Образцы для выделения вируса берут, соблюдая правила асептики, одновременно помещая их в формалин для выполнения гистологических исследований.

Транспортировка.

Доставка проб в лабораторию должна осуществляться в максимально короткий срок, так как содержание вируса в отсутствие живых клеток быстро снижается. Повторное замораживание и оттаивание губительны для ряда вирусов (особенно возбудителей респираторных вирусных инфекций), поэтому при транспортировании образцы помещают в контейнеры с температурой 2-40 С. Если время доставки превышает 30-40 мин и пробы не могут быть тотчас исследованы, материал замораживают при -80°С в сухом льду или помещают в жидкий азот при -1800 С.

## **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Способы забора биологического материала для исследования.
2. Способы хранения и транспортировки биологического материала.

## САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных способов получения биологического материала.
2. Записать условия хранения и транспортировки основных видов биологического материала.

### Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

1. Сыворотку крови получают путем...
  - а) спонтанно свернувшейся цельной крови с последующим центрифугированием;
  - б) центрифугирования крови с антикоагулянтом;
  - в) центрифугирования нативной крови.
2. Плазму крови получают путем...
  - а) спонтанно свернувшейся цельной крови с последующим центрифугированием;
  - б) центрифугирования крови с антикоагулянтом;
  - в) центрифугирования нативной крови.
3. В сыворотке крови в отличие от плазмы отсутствует...
  - а) фибриноген;
  - б) альбумин;
  - в) комплемент;
  - г) антитромбин.
4. Цитрат и оксалат стабилизируют плазму за счет...
  - а) связывания ионов кальция;
  - б) активации антитромбина;
  - в) предупреждения активации фактора Хагемана;
  - г) ингибирования тромбопластина;
  - д) ингибирования акцелератора.
5. Гепарин стабилизируют плазму за счет...
  - а) активации антитромбина;
  - б) связывания ионов кальция;
  - в) ингибирования превращения протромбина в тромбин;
  - г) ингибирования тромбопластина;
  - д) ингибирования акцелератора.
6. Фторид натрия, химическая добавка, используемая при взятии крови на анализ для...
  - а) активации антитромбина;
  - б) связывания ионов кальция;
  - в) прекращения метаболизации глюкозы в крови;
  - г) ингибирования тромбопластина;
  - д) ингибирования акцелератора.
7. Моча, собранная для анализа, может храниться в холодильнике...
  - а) не более 20 минут;
  - б) не более 2 часов;
  - в) не более 4 часов;

- г) не более 24 часов.
8. Желудочную секрецию исследуют...
- а) внутрижелудочной рН-метрией;
  - б) уреазным тестом;
  - в) рентгенологическими методами;
  - г) ультразвуковыми методами.
9. В сыворотке крови, в отличие от плазмы, отсутствует...
- а) альбумин;
  - б) комплемент;
  - в) калликреин;
  - г) фибриноген.
10. Перед исследованием кала больной не должен...
- а) пить;
  - б) принимать пищу;
  - в) принимать слабительные;
  - г) проводить туалет наружных половых органов.

#### Ситуационная задача

Во время центрифугирования разбилась стеклянная пробирка с кровью, и произошло разбрызгивание содержимого пробирки внутри центрифуги. Ваши действия.